

*Б.Т.Величковский*

Об экспресс-методе прогнозирования возможного патологического влияния наночастиц на организм

Российский государственный медицинский университет: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

B.T. Velichkovsky

Express-method for predicting probable hazardous effects of nano-particles on a human

Key words: nanoparticles, prediction, biological hazard.**Ключевые слова:** наночастицы, прогнозирование, опасность биологического действия.

В связи с активным развитием производства и применения наноматериалов появилась новая актуальная задача — определение потенциального вреда наночастиц для здоровья человека. Подобный вред, по-видимому, возможен. В эксперименте на животных установлен высокий уровень задержки наночастиц в легких, а также их способность проникать через аэрогематический барьер в ткани организма. При введении в кровь они преодолевают гематоэнцефалический барьер и откладываются в мозгу. Показано, что в модельных клеточных опытах наночастицы особой формы, фуллерены, могут повредить молекулу ДНК — "расплести", разрезать.

К наноматериалам и наноструктурам относят разнообразные объекты, величина которых хотя бы в одной из 3 размерностей < 100 нм (1 нм — 10^{-6} м, или 10 ангстремов). Они могут быть 3-мерными (фуллерены, нанокристаллы), 2-мерными (нанотрубки), 1-мерными (нанопленки).

В зависимости от происхождения различают 2 вида наноструктур: природные и искусственные. К природным наноструктурам относятся вирусы малых размеров, молекулы ДНК. Искусственные наноструктуры создаются на основе современных наукоемких технологических процессов.

Крупномасштабное производство наночастиц основано на 3 механизмах их образования: конденсации из газовой фазы, осаждении из коллоидного раствора и дезинтеграции твердого вещества.

Кроме полезных нанопроductов, в ряде производств возникают побочные техногенные наночастицы. Они содержатся в дыме металлургических и химических предприятий, в выхлопных газах бензиновых и дизельных двигателей, в аэрозолях конденсации, образующихся при газо- и электросварочных работах. Кстати, первичные размеры частиц табачного дыма обычных сигарет целиком находятся в пределах нановеличин.

Ведущими в характеристике наночастиц являются свойства поверхности. От них зависит их стабиль-

ность и реакционная способность, полупроводниковые, магнитные, оптические и механические свойства, а также особенности биологического действия. Трудные проблемы для медицины создают как уникальные свойства, так и значительное разнообразие наночастиц.

В настоящее время наиболее широко используются 3 группы наночастиц, причем чаще всего углеродные. Самая известная из них — фуллерен. Это молекула углерода, состоящая из 60 атомов и напоминающая футбольный мяч, сшитый из правильных многоугольников (рис. 1). Другая многочисленная разновидность — нанотрубки из правильных углеродных 6-угольников с соотношением длины к диаметру $> 3 : 1$. Оба описанных типа углеродных наноструктур отличает механическая прочность, превышающая прочность стали, химическая инертность, электропроводность, каркасное (полое) строение, с толщиной стенки в 1 молекулу.

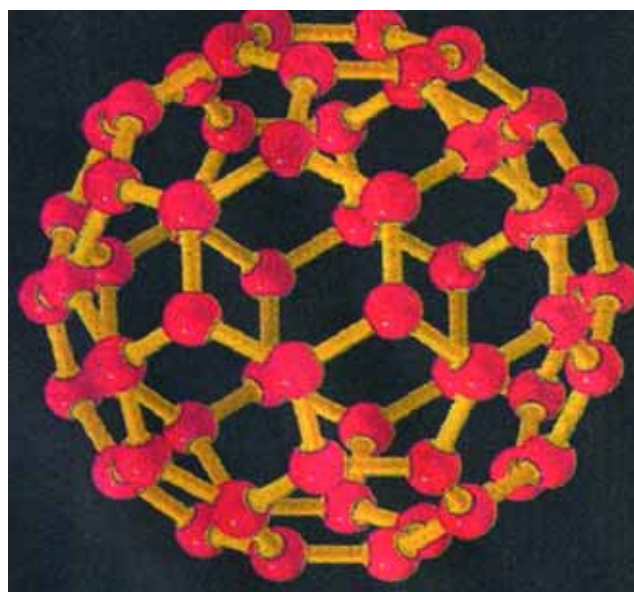


Рис. 1. Молекула фуллерона

Вторую группу, имеющую широкое коммерческое применение, составляют наночастицы оксидов металлов, преимущественно TiO_2 , ZnO , Al_2O_3 . Они обладают каталитическими, полупроводниковыми и другими уникальными свойствами и используются в микроэлектронике, энергетике, химической промышленности.

В 3-ю группу входят композиционные наноматериалы, не содержащие ни углерода, ни металлов. Типичным ее представителем является многотоннажный технический продукт — аэросил, аэрозоль конденсации диоксида кремния, получаемый при сжигания SiCl_4 либо кремний-органических мономеров в контролируемой среде. Наночастицы аэросила имеют удельную поверхность 175–380 $\text{м}^2/\text{г}$, средний эквивалентный диаметр 0,01–0,02 $\mu\text{м}$ (10–20 ангстремов) и отличаются значительной монодисперсностью: их диаметр укладывается в диапазон 0,005–0,050 $\mu\text{м}$ (5–50 ангстремов). Аэросил используется как наполнитель в производстве особо прочных резиновых шин, как загуститель при получении машинного масла, а также в пищевой, фармацевтической и парфюмерно-косметической промышленности.

Чрезвычайно высокая поверхностная энергия наночастиц обуславливает их почти мгновенную коагуляцию в воздухе рабочей зоны и образование крупных оседающих хлопьев. Наглядно воздушную коагуляцию наночастиц демонстрирует процесс возникновения табачного дыма, благодаря которому он и становится виден.

Для наночастиц весовой метод определения их содержания в воздухе непригоден. Любые варианты счетного метода также недостаточно информативны. В настоящее время для характеристики экспозиции наночастиц в воздухе рабочей зоны наиболее приемлемой и доступной, по-видимому, можно признать 2-этапную комбинацию определения весовой концентрации респираторной фракции пыли с последующим определением суммарной поверхности отобранной пылевой навески методом адсорбции азота или другого инертного газа по уравнению Брунауэра–Эммета–Теллера. В результате рассчитываются величины удельной поверхности витающих наночастиц на конкретном рабочем месте. Именно по этому показателю — величине удельной поверхности витающей пыли — и следует нормировать предельно допустимую концентрацию наночастиц в воздухе.

В дальнейшем, вероятно, можно будет применять устройства прямого определения суммарной поверхности наночастиц, основанные на высокой адсорбционной способности их поверхности. Например, может быть использовано изменение стандартной концентрации светящегося газообразного эталонного вещества при прохождении через измерительную кювету прибора воздушного потока с наночастицами.

Президиум РАМН среди 5 наиболее актуальных направлений изучения нанотехнологий выделил:

- фундаментальные аспекты взаимодействия наночастиц с клеточными и субклеточными структурами организма;

- проблемы безопасности при разработке и использовании нанотехнологий и наноматериалов.

С 1 декабря 2007 г. введены в действие методические рекомендации "Оценка безопасности наноматериалов", утвержденные руководителем Роспотребнадзора, главным санитарным врачом РФ, акад. РАМН Г. Г. Онищенко. Этот документ призван обеспечить единый, научно обоснованный подход к оценке безопасности наноматериалов на этапах разработки, экспертизы и государственной регистрации подобной продукции. Для изучения взаимодействия наночастиц с биологическими макромолекулами и клеточными мембранами и для выяснения возможности проникновения через биологические барьеры рекомендованы следующие 13 методов:

- атомно-силовая микроскопия;
- сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия;
- светоптическая флуоресцентная микроскопия;
- светоптическая конфокальная микроскопия;
- спектрометрия деполяризации флуоресценции;
- спектрометрия кругового дихроизма;
- спектрофлуориметрия;
- ЯМР-спектроскопия (ЯМР — ядерный магнитный резонанс);
- ЭПР-спектроскопия (ЭПР — электронный парамагнитный резонанс);
- масс-спектрометрия;
- метод радиоактивных индикаторов;
- аналитическое ультрацентрифугирование;
- жидкостная хроматография высокого разрешения.

В большинстве медицинских организаций профилактической направленности нет специального оборудования, отсутствуют специалисты, способные эксплуатировать перечисленные приборы. Поэтому пока необходимо опираться на накопленные ранее данные и те методы исследования, посредством которых эти сведения в свое время были получены. Такой информации в методических рекомендациях, к сожалению, нет. К тому же по своей структуре данный документ ориентирован в основном на оценку наноматериалов, попадающих в организм *per os*.

Для предварительной характеристики особенностей биологического влияния наночастиц на организм следует получить представление о том, каков механизм взаимодействия их поверхности с окружающей средой. Химия поверхности твердых тел вообще представляет собой одну из важнейших проблем естествознания и техники.

В ходе эволюции легкие приспособились к борьбе с возбудителями инфекции дыхательных путей и в меньшей степени оказались подготовленными к воздействию неорганических микрочастиц. При контакте возбудителя инфекции, иммунного комплекса или пылевой частицы с мембраной фагоцита уровень потребления кислорода повышается столь интенсивно, что это явление получило название "дыхательного взрыва". Например, при активации макрофагов частицами кварца потребление кислорода увеличивается в 4 раза, частицами угольной пыли или диоксида титана — в 1,5 раза. Практически

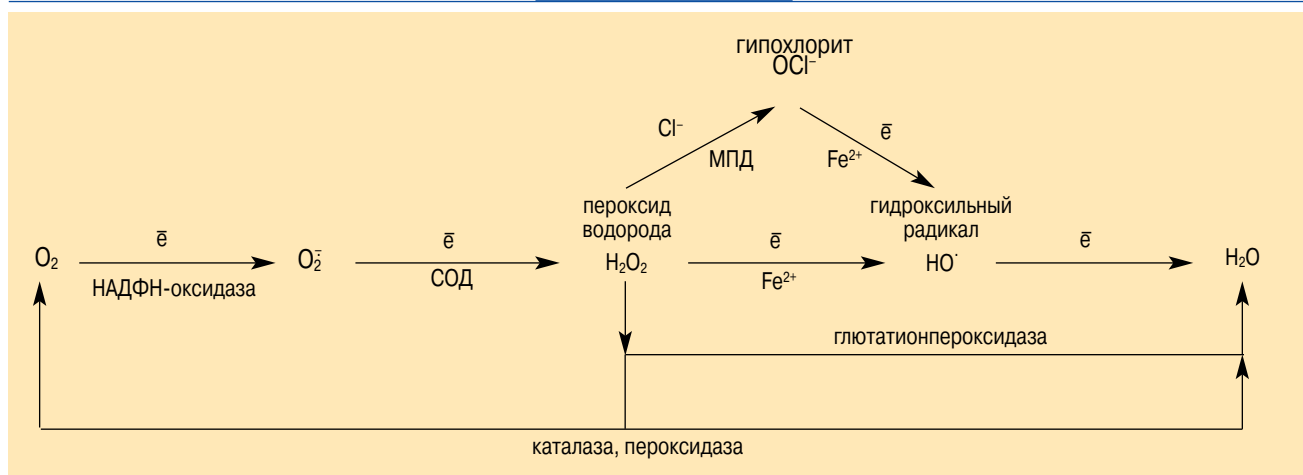


Рис. 2. Одноэлектронный путь восстановления O_2 в организме
Примечание: СОД – супероксиддисмутаза; МПД – миелопероксидаза.

весь дополнительно поглощенный кислород не используется ни для энергетических, ни для пластических нужд клетки.

Особая ферментная система фагоцитов, встроенная во внешнюю клеточную мембрану, — НАДФН-оксидаза изменяет электронную структуру молекулы кислорода, превращая его в главное оружие бактерицидной защиты клетки — активные формы кислорода (АФК), а состояние длительного избыточного образования АФК называют окислительным стрессом (рис. 2).

В бактерицидной защите органов дыхания принимает участие и оксид азота (NO). Этот газ имеет свойства свободного радикала благодаря непарному электрону на внешней орбитали молекулы. Он синтезируется фагоцитами из аминокислоты аргинина посредством фермента NO-синтазы (рис. 3).

Таким образом, первичный ответ организма на действие нерастворимых частиц стереотипен и заключается в мобилизации неспецифических бактерицидных систем фагоцитов. Об интенсивности этого процесса можно судить по уровню люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) фагоцитов. Схема метода показана на рис. 4. Суспензия одних макрофагов дает лишь слабое спонтанное свечение, а взвесь корпускулярных частиц обычно не вызывает его совсем. При контакте же таких частиц с макрофагами развивается ХЛ, отражающая динамику образования свободных радикалов кислорода.

Основываясь на опыте изучения биологического действия различных субмикроскопических аэрозолей конденсации, можно выделить 5 групп наночастиц в зависимости от биологически значимого межмолекулярного взаимодействия их поверхности с мембраной фагоцита.

К 1-й группе относятся наночастицы симметричного внутреннего строения, для которых контакт по-

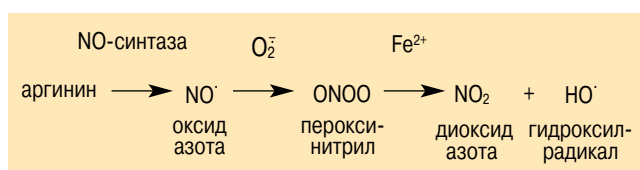


Рис. 3. Синтез и окислительные превращения NO в организме

верхности с окружающей средой обусловлен самым слабым универсальным неспецифическим межмолекулярным взаимодействием, вызываемым флуктуациями электронов в пограничном слое частицы. Это углеродные наночастицы с абсолютно однородной, чистой поверхностью. Электростатическое взаимодействие наночастиц с клеточной мембраной обуславливает физиологичный тип активации фагоцитов. Он характеризуется постепенным нарастанием, низким уровнем и медленным затуханием ХЛ-свечения клеток. Фагоцитоз подобных частиц обуславливает "гипертрофический" механизм гибели кониофага. Клетка, поглощающая большое количество таких частиц, длительное время остается жизнеспособной, подвижной и увеличивается в объеме. Происходит типичная "рабочая" гипертрофия кониофага на внутриклеточном уровне. Гипертрофированные кониофаги, естественно, должны потреблять повышенное количество кислорода. Однако с увеличением размеров клетки отношение площади ее поверхности к объему прогрессивно снижается, поскольку масса клетки возрастает пропорционально кубу, а поверхность — квадрату линейных размеров. Поэтому в расчете на единицу массы потребление кислорода уменьшается, нарушается режим работы митохондрий, и в конце концов клетка погибает. В медицине труда указанный сценарий наблюдается при воздействии

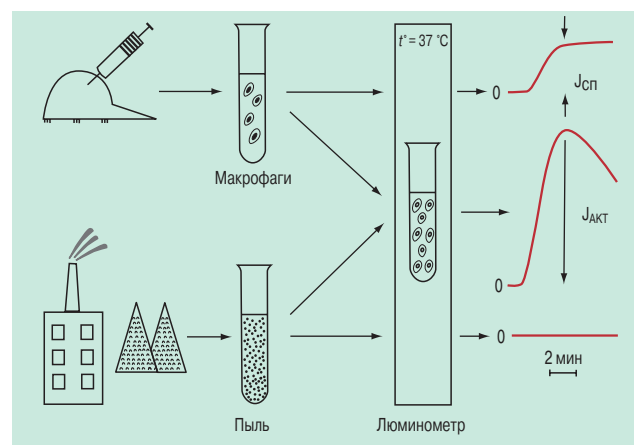


Рис. 4. Хемилюминесцентное определение способности наночастиц активировать макрофаги

низкоцитотоксичной пыли алмаза, кристаллического кремния, эльбора и др.

На примере углеродных наночастиц наиболее наглядно прослеживается биологическое значение наноразмерности. Материал, характеризующийся электростатическим типом взаимодействия поверхности с мембраной фагоцитов, обладает высокой совместимостью с тканями организма, не вызывает ни воспаления, ни отторжения. Поэтому из углеродистых наноматериалов производятся наиболее легкие, прочные и долговечные протезы суставов, костей, зубов. Пока они дороги, но со временем станут более доступными и, по-видимому, наиболее востребованными. Однако в связи с наноразмерами эти углеродистые материалы проникают и накапливаются не только в протоплазме клетки, но и в ее ядре, вызывая патологические изменения ДНК и, значит, становясь потенциальными канцерогенами.

Все современные технологии получения углеродных нанотрубок требуют применения металлических катализаторов, следы которых загрязняют их поверхность. В состав катализаторов чаще всего входят кобальт, никель, железо и их сочетания. Наночастицы, содержащие в пограничном слое катионы таких металлов-аллергенов, как никель и кобальт, входят во 2-ю группу биологически значимых взаимодействий. Ионы металлов-аллергенов способны покидать поверхность частиц и переходить в тканевую жидкость. Там они связываются с белковыми молекулами и в итоге могут вызвать аллергическую реакцию. Типичным примером подобного действия являются аэрозоли полиметаллических руд, вызывающие особую форму пневмокониоза с гиперреактивными проявлениями.

Наночастицы, содержащие в пограничном слое ионы железа или других переходных металлов, составляют 3-ю биологически значимую группу. У таких частиц на каталитических центрах поверхности происходит вторичная трансформация бактерицидных продуктов, образованных активированными фагоцитами. При этом возникает наиболее агрессивный из всех свободных радикалов — гидроксильный радикал $\text{OH}\cdot$, который запускает цепную реакцию перекисного окисления липидов клеточных мембран и может вызвать окислительное повреждение молекул РНК и ДНК. Подобным механизмом биологического действия характеризуются волокнистые пылевые частицы асбеста, содержащие в пограничном слое катионы железа. Все разновидности асбестовых волокон в той или иной степени являются канцерогенами.

В 4-ю группу входят наночастицы с гидратированной поверхностью, обладающей способностью к специфическим электростатическим взаимодействиям, ориентированным в пространстве за счет образованию водородных связей ($\text{A}-\text{OH}\cdots\text{B}$). Классическим образцом такого вещества является кремнезем. Кварцевая пыль даже в вакууме в считанные минуты адсорбирует остаточные молекулы воды, образуя состоящую из силанольных групп ($\text{Si}-\text{OH}$) гидроксильрованную поверхность. Покрытая сила-

нольными группами, данная поверхность обуславливает не только химическую инертность и устойчивость кремнезема в обычных условиях земной атмосферы, но и его высокую фиброгенность и невысокую, но уже доказанную канцерогенность.

Последнюю, 5-ю, группу составляют наночастицы, поверхность которых способна к межмолекулярным взаимодействиям за счет электростатического связывания, вызванного неравномерным распределением электронной плотности на поверхности излома, создающим неориентированный в пространстве суммарный эффективный заряд частицы. Чем выше дзета-потенциал такой частицы, тем больше ее способность активировать фагоциты. Подобным действием обладает фиброгенная пыль, не содержащая свободного диоксида кремния.

Таким образом, потенциально опасны для организма все 5 групп наночастиц. Главная особенность заключается в том, что наноразмерность повышает цитотоксичность частиц. В основе подобной реакции лежит механизм активации фагоцитов, главным образом макрофагов и дендритных клеток. Для запуска этого процесса необходим одновременный многоточечный контакт частиц с поверхностью клетки. Это условие и обеспечивают наноразмеры частиц. Что касается аэрозолей, то здесь химический состав, по-видимому, не столь важен. Литейную лихорадку, как известно, вызывает дым не только оксида цинка, но и других металлов и даже полимерных частиц.

Все наночастицы должны рассматриваться как потенциальные канцерогены. Менее вероятно их фиброгенное влияние, т. к., прежде чем в ткани накопится необходимое "пылевое депо", проявится их повышенная цитотоксичность. На это указывают экспериментальные исследования с аэросилом. Интратрахеальное введение стандартной дозы (50 мг) этого наиболее высокодисперсного конденсата диоксида кремния вызывало быструю гибель всех подопытных крыс. Введение дозы, в 4 раза меньшей, приводило к развитию только клеточно-пылевых узелков, которые исчезали через 2 нед. по мере растворения и выведения из легких остатков наночастиц, оставляя после себя расширенные деформированные ацинусы с разрушенными альвеолярными стенками.

Более ожидаемым является развитие в органах дыхания патологического процесса, подобного эмфиземе. В основе подобных изменений лежит деструкция легочной ткани, обусловленная действием свободных радикалов, которые генерируются активированными фагоцитами. Такой процесс подобен профессиональному экзогенному фиброзирующему альвеолиту, впервые описанному *Н.К. Вознесенским* у плавильщиков бронзовых сплавов, подвергавшихся воздействию дыма оксида цинка на протяжении 10–15 лет. Он опасен развитием гипоксемии и легочно-сердечной недостаточности.

В настоящее время доказано, что саркоидоз, характеризующийся формированием макрофагальных гранул в лимфатических узлах, легких, сердце

и других тканях, может быть вызван зернистыми формами микобактерий туберкулеза. Они, как и другие L-формы микробов, по размерам относятся к наноматериалам. Но неизвестна ХЛ-характеристика свойств поверхности подобных форм микробов, поэтому нельзя сопоставить их со свойствами поверхности неорганических наночастиц и предположить вероятность провоцирования подобных изменений.

Несмотря на высокую биологическую активность наноматериалов, ни в коем случае не следует преувеличивать их потенциальную опасность. В связи с тем, что огромная удельная поверхность наночастиц обуславливает их практически мгновенную коагуляцию в воздухе рабочей зоны и достаточно быстрое оседание в виде хлопьев, возникновение опасных концентраций наноматериалов представляется маловероятным. Об этом свидетельствует, в частности, опыт отдела молекулярной биологии РГМУ (Москва), исследовавшего опасность развития профессиональной патологии у рабочих французской корпорации *Snecma Moteurs*. Рабочие, занятые в армировании сопел ракет и вентиляционных лопаток турбореактивных двигателей, жаловались на воспаление слизистой глаз и раздражение кожных покровов. В связи с высокой кратностью воздухообмена в производственных помещениях запыленность воздуха весовым методом практически не определялась. Дирекция заподозрила наличие в углеродистых нановолокнах каких-то неизвестных аллергенов. Исследования показали, что причиной стал высокий модуль упругости указанных волокон, превышающий прочность стали. Попадая на слизистую глаз, такая мельчайшая острая частица, не различимая даже для аппаратуры окулиста, механически ранит ее и вызывает травматическое воспаление. Снабжение рабочих соответ-

ствующей спецодеждой позволило ликвидировать объективные изменения.

Для предприятий, производящих и использующих наночастицы любого состава и происхождения, как и для производств, характеризующихся поступлением в воздух рабочей зоны высокодисперсных аэрозолей конденсации оксидов металлов, общеобменная вентиляция малоэффективна. Более рациональна местная вытяжная вентиляция в виде индивидуального бортового отсоса со скоростью всасывания 3,0–3,5 м/с и сдува, отклоняющего от лица рабочего поток образующихся аэрозолей и увлекающего их в сторону воздухоприемника.

Наиболее быстрым, информативным и относительно дешевым способом выявления характера биологического воздействия наночастиц является ХЛ-метод исследования. Хемилуминометры выпускаются отечественными приборостроительными фирмами и стоят несравненно меньше приборов, рекомендуемых Роспотребнадзором. Информация об отечественных хемилуминометрах имеется в Интернете. Все варианты ХЛ-исследования нерастворимых микрочастиц тщательно разработаны и опубликованы, в частности в методическом пособии "Методы определения влияния фиброгенной пыли на организм в эксперименте и клинике" (2003). Поэтому ХЛ-метод следует дополнительно внести в перечень, приведенный в методических рекомендациях Роспотребнадзора "Оценка безопасности наноматериалов".

Информация об авторе

Величковский Борис Тихонович – акад. РАМН, д. м. н., проф., главный научный сотрудник отдела молекулярной биологии РГМУ; тел.: (495) 434-82-19; e-mail: borisvel@proc.ru

Поступила 22.05.09
© Величковский Б.Т., 2009
УДК 612.014.46